



⑱ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 08 089 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 100 08 089.8
㉔ Anmeldetag: 22. 2. 2000
㉕ Offenlegungstag: 31. 10. 2001

㉖ Int. Cl.⁷:
C 07 K 5/078
C 07 D 277/56
C 07 D 207/26
C 07 D 207/38
C 07 D 213/79
C 07 C 271/22
C 07 F 7/18
// C07M 7:00

DE 100 08 089 A 1

㉗ Anmelder:
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 38124 Braunschweig, DE

㉘ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Forstmeyer,
81541 München

㉙ Erfinder:
Höfle, Gerhard, 38124 Braunschweig, DE; Leibold,
Thomas, 38124 Braunschweig, DE; Steinmetz,
Heinrich, 38124 Braunschweig, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ㉚ Syntheseverfahren zur Herstellung von Tubulysinen
㉛ Erfindungsgemäß wird die absolute Konfiguration von
Tubulysin, ein Verfahren zur Herstellung von Tubulysinen
und die dabei eingesetzten Zwischenprodukte offenbart.

DE 100 08 089 A 1

[0001] Erfindungsgemäß wird die absolute Konfiguration von Tubulysin, ein Verfahren zur Herstellung von Tubulysinen und die dabei eingesetzten Zwischenprodukte offenbart.

5 [0002] Vor kurzem haben wir die Tubulysine (1) als eine neue, auf das Tubulin-Skelett wirkende, Substanzfamilie aus Myxobakterien in Irsee vorgestellt [1]. Im Gegensatz zu den Epothilonen zeigen diese eine mikrotubuli-abbauende Wirkung sowie die vermehrte Ausbildung von Zentrosomen [1] (s. **Abb. 1**). Mit einer Cytotoxizität von $IC_{50} = 10-500$ pg sind die Tubulysine als potentielle Cytostatika von besonderem Interesse.

10 [0003] Die Aufklärung der Konstitution erfolgte mit spektroskopischen Methoden, insbesondere 2D-NMR-Techniken, und durch Einbau von ^{13}C -markiertem Acetat und Methionin. Aufgrund der außergewöhnlichen Aktivität und einer interessanten Ähnlichkeit zu dem analog wirkenden Dolastatin 10[2a] (s. **Abb. 2**) wurde ein Programm zur Aufklärung der absoluten Konfiguration sowie anschließender Totalsynthese des Tetrapeptids in Angriff genommen.

15 [0004] Die Konfigurationszuordnung erfolgte durch Vergleich der durch Totalhydrolyse erhaltenen Aminosäuren mit den entsprechenden Synthese-Intermediaten mittels GC- und HPLC-Analytik. Die Tubulysine enthalten nur eine proteinogene (natürliche) Aminosäure, Isoleucin. Für die Synthese der drei weiteren Bestandteile wurde erfindungsgemäß stets ein enantio- bzw. diastereoselektiver Syntheseweg entwickelt.

[0005] Es zeigen:

[0006] **Fig. 1:** Vermehrte Ausbildung von Zentrosomen und Abbau der Mikrotubuli bei Tubulysin D Zugabe (0,5 ng/ml, PtK₂ Zellen der Beuteltatze);

20 [0007] **Fig. 2:** Tubulysine A-F, Biogenesestudie und Vergleich mit Dolastatin 10 bzw. Lu 103793 [2b];

[0008] **Fig. 3a:** 1H -NMR-Spektrum von Tubulysin A (MSO, 400 MHz);

[0009] **Fig. 3b:** ^{13}C -NMR-Spektrum von Tubulysin A (DMSO, 400 MHz);

[0010] **Fig. 4:** GC-Spektren von Baustein I (FS-Hydrodex β -3P, 25 m, 120°C);

[0011] **Fig. 5:** GC-Spektren von Baustein II (PermaBond L-Chirasil-Val, 25 m, 80°C);

25 [0012] **Fig. 6:** GC-Spektren von Baustein IV (FS-Hydrodex β -3P, 25 m, 165°C);

[0013] **Fig. 7:** Relative Konfiguration von 16 (δ in ppm) (W. A. König et al. Liebigs Ann. Chem., 1987, 803-807);

[0014] **Fig. 8:** GC-Spektren von Baustein III (PermaBond L-Chirasil-Val, 25 m, 80°C);

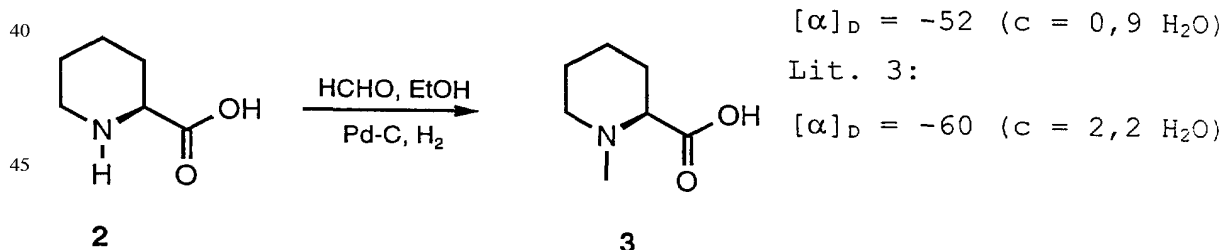
[0015] **Fig. 9:** Absolute Konfiguration von Tubulysin 1;

30 Synthese der Aminosäurebausteine

Baustein I: N-Methyl-pipecolinsäure (Mep)

35 [0016] Enantiomerenreine N-Methyl-pipecolinsäure 3 wurde durch reduktive Aminierung von L-Pipecolinsäure 2 dargestellt (s. Schema 1). Racemische N-Methyl-pipecolinsäure 3* wurde durch Verseifung von käuflichem Ethylester-Racemat hergestellt.

Schema 1 Synthese von L-N-Methyl-pipecolinsäure



50

Baustein II: Isoleucin (Ile, allo-Ile)

[0017] Alle GC-Derivate wurden direkt aus den käuflichen Isoleucin- bzw. allo-Isoleucin-Enantiomeren dargestellt.

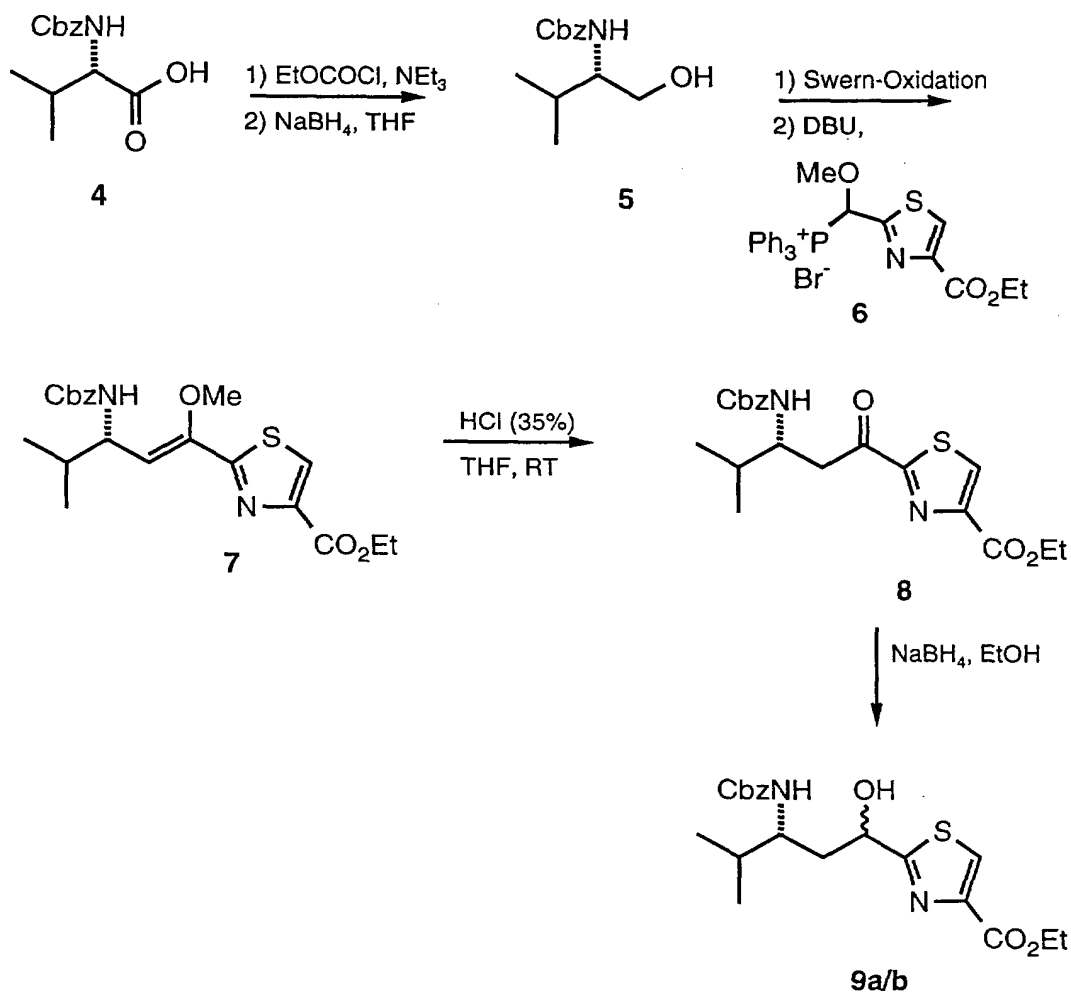
55 Baustein III: 2-(3-Amino-1-hydroxy-4-methyl-pentyl)-thiazol-4-carbonsäure (Tubuvalin, Tuv)

[0018] Ausgehend von N-Cbz-L-Valin 4 wurde der Aminoalkohol 5 dargestellt, der nach Swern-Oxidation mit dem Thiazol-Wittig-Ylid 6 zum Enolether 7 umgesetzt wurde.

60 [0019] Saure Hydrolyse des Enolethers lieferte Keton 8, welches durch Reduktion mit Natriumborhydrid in die diastereomeren, geschützten Tuv-Analoga 9a/b überführt wurde. Entsprechend wurde auch das Racemat 8* erhalten (s. Schema 2)

65

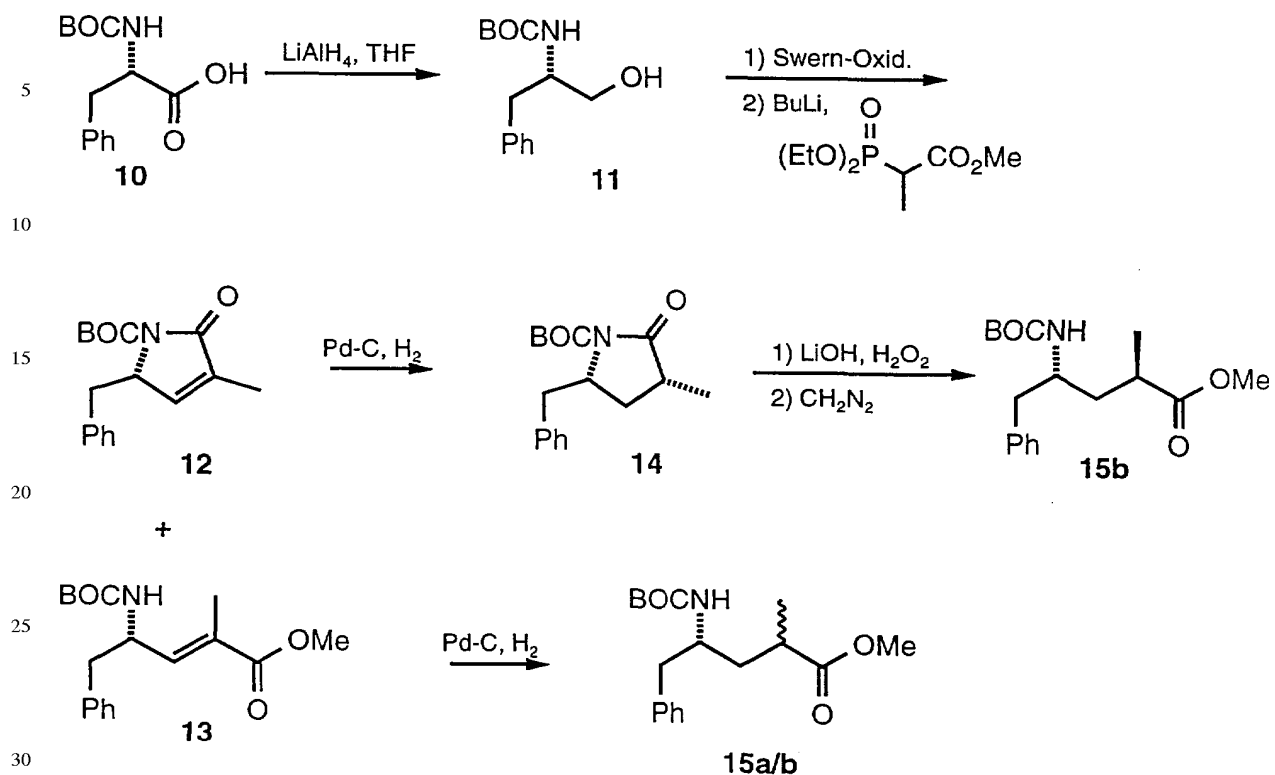
Schema 2 Darstellung des Bausteins III (9)



Baustein IV: 4-Amino-5-phenyl-2-methyl-pentansäure (Tubuphenylalanin, Tup)

[0020] N-BOG-L-Phenylalanin 10 wurde durch Reduktion, Reoxidation mittels Swern-Oxidation und abschließende Wittig-Reaktion um eine C_3 -Einheit verlängert. Es wurden zwei Produkte erhalten, bei denen es sich um das offenkettige E-Additionsprodukt 13 sowie das Lactam 12 handelte. Chromatographische Trennung und Hydrierung lieferte aus 13 ein 2 : 1 Isomerengemisch 15a/b, während aus 12 nur das BOC-geschützte Lactam 14 mit 2R/4R-Konfiguration entstand. Nach Ringöffnung und Veresterung mit Diazomethan wurde hieraus diastereomerenreines 15b erhalten (s. Schema 3).

Schema 3 Aufbau von Baustein IV ausgehend von Phenylalanin



Konfigurationsaufklärung durch GC-Vergleich an chiralen Phasen

Totalhydrolyse und Derivatisierung

[0021] Tubulysin wurde für 12 h mit 6 N Salzsäure, bzw. für die Bestimmung von Baustein IV mit Hydrazin-Hydrat bei 100°C abgebaut. Anschließende Veresterung mit methanolischer bzw. ethanolischer Salzsäure bei 100°C und Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid lieferte die für die Messungen verwendeten Derivate. Die synthetisch aufgebauten Vergleichssubstanzen wurden unter identischen Bedingungen derivatisiert.

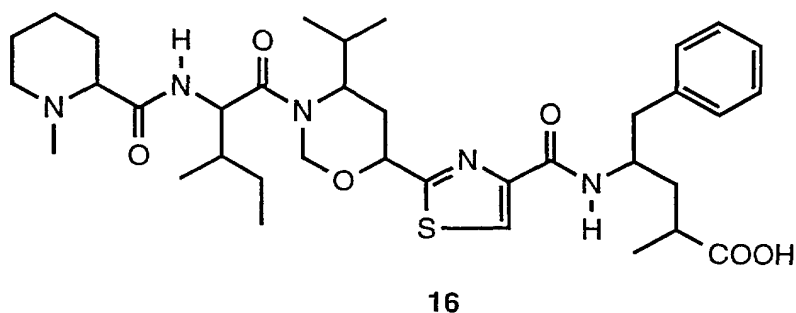
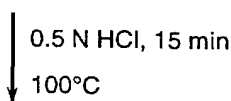
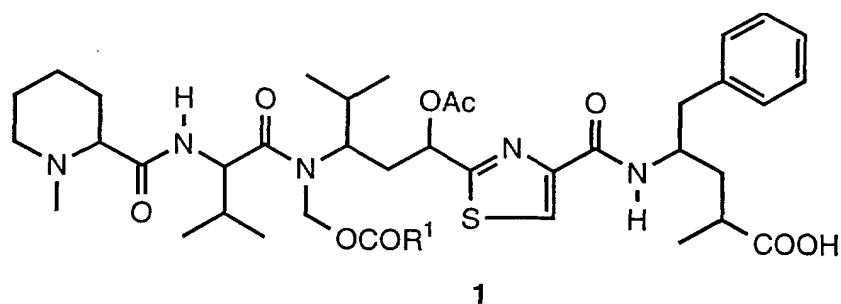
[0022] Da bei saurer Hydrolyse eine teilweise Epimerisierung an C-2 des Bausteins IV aufgetreten war, wurde für die Bestimmung der C-terminalen Aminosäure Hydrazin-Hydrat, ohne beobachtbare Epimerisierung, eingesetzt.

Konfigurationsaufklärung von Baustein III

[0023] Die Zuordnung der absoluten Konfiguration von Baustein III sollte zunächst wie bereits für die anderen Bausteine beschrieben erfolgen. Überraschenderweise wurde nach der Derivatisierung von reinem 9a eine starke Racemisierung des benzylichen Zentrums festgestellt (20–40%). Dies war bei der Derivatisierung von Tubulysin ebenfalls zu beobachten (vollständige Racemisierung), weshalb eine direkte Zuordnung auf diesem Weg nicht möglich war.

[0024] Im Verlauf der Hydrolyse der beiden O-Acylgruppen konnten wir ein Tubulysin-Derivat 16 mit cyclischem N,O-Acetal isolieren, welches zweifelsfrei zumindest die relative Konfigurationszuordnung der beiden Zentren ermöglichte (s. Schema 4).

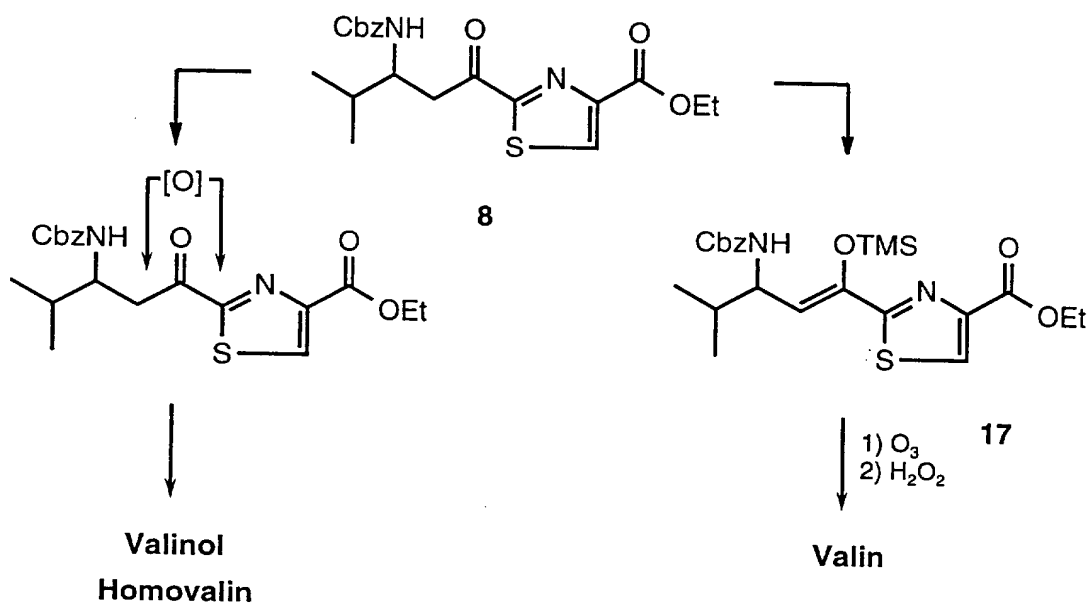
Schema 4 Synthese eines Tubulysin-Derivats mit cyclischem Acetal



[0025] Durch Vergleich der NMR-Daten von 16 mit Literaturwerten wurde für Baustein III eine relative trans-Konfiguration abgeleitet (s. Abb. 7).

[0026] Der Versuch, die noch fehlende absolute Konfiguration an C-3' durch Vergleich auf der Keto-Stufe 8 (s. Schema 5) durchzuführen, scheiterte, da auf verschiedenen chiralen GC- und HPLC-Säulen keine Trennung der Enantiomeren erreicht werden konnte. Ein weiterer Abbau sollte nun durch Bayer-Villiger-Oxidation/-Hydrolyse und Vergleich der Produkte mit Valinol bzw. Homovalin erfolgen. Da die Reaktion selbst mit Pertrifluoressigsäure extrem langsam verlief (< 2% Umsatz in 7d), wurde ein ozonolytischer Abbau untersucht. Umsetzung von 8 mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat lieferte zunächst Silylenolether 17, der nach Ozonolyse und oxidativer Aufarbeitung sowie Veresterung zu N-Cbz-Valinethylester abgebaut wurde (s. Schema 5).

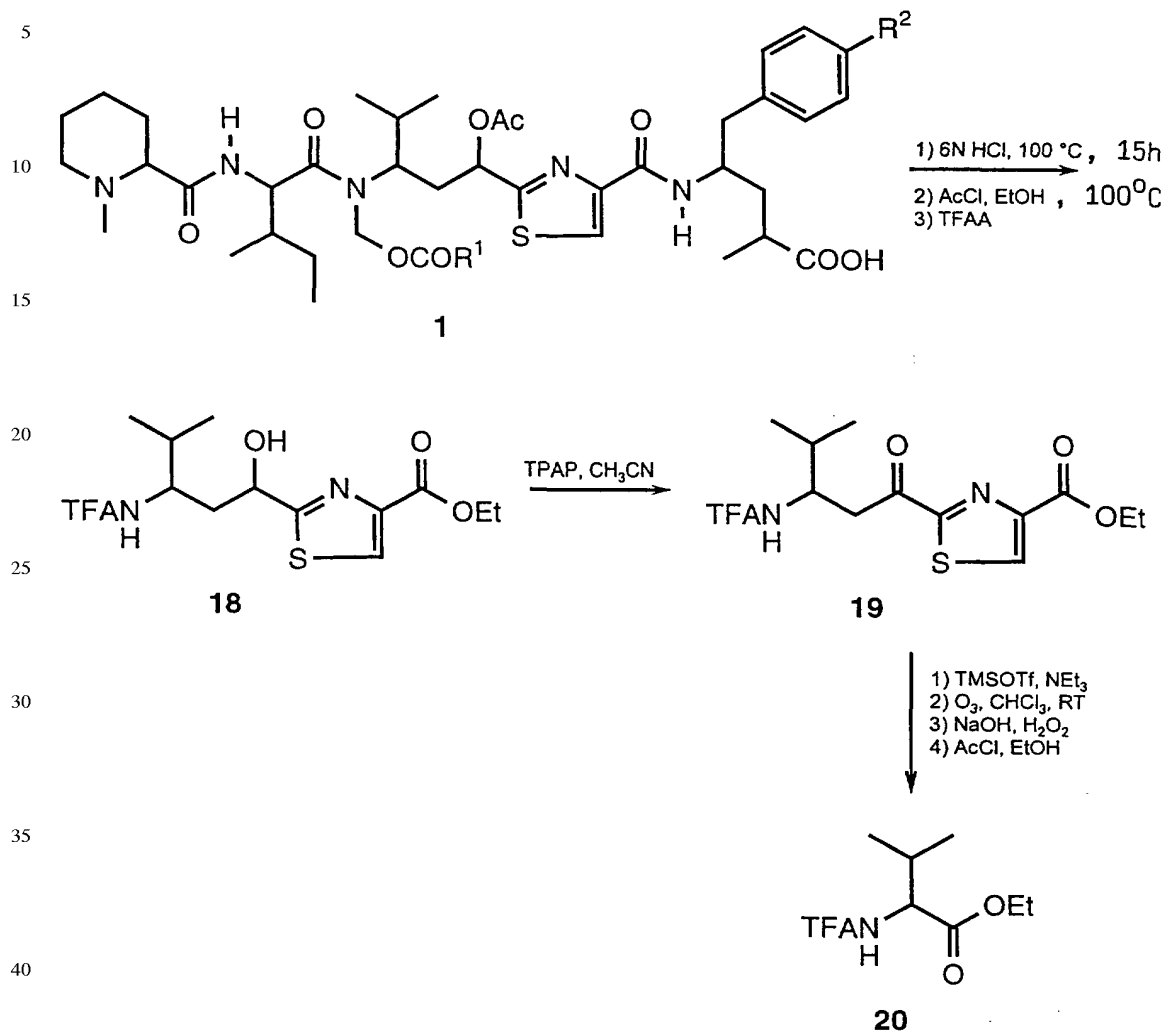
Schema 5 Abbauprobversuche ausgehend von Keton 8



[0027] Durch Anwendung dieser Abbau-Sequenz auf die aus Tubulysin hergestellte Aminosäure 19 konnte nun dem

letzten Stereozentrum die L-Konfiguration zugeordnet werden (s. Schema 6 und **Abb. 8**).

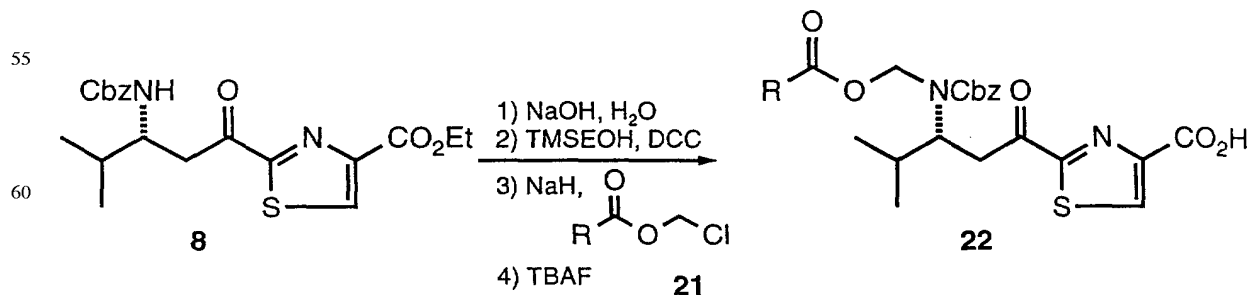
Schema 6 Abbau von Tubulysin zu 20



[0028] Aus den Ergebnissen der GC-Untersuchungen ergibt sich für Tubulysin folgende absolute Konfiguration (s. **Abb. 9**):

[0029] Zunächst sollte eine konvergente Totalsynthese von Tubulysin D unter weitgehender Verwendung der bisher dargestellten Aminosäuren durchgeführt werden (s. Schema 9). N-Methylpipecolinsäure wurde in racemischer Form eingesetzt, eine Trennung erfolgte dann auf der Dipeptid-Stufe 27a/b. Baustein III wurde wie bereits beschrieben synthetisiert, der entscheidende Punkt ist hier der selektive Aufbau des Amidoacetals (s. Schema 7). Es ist vorgesehen, die 2'-Hydroxyfunktion im Baustein erst auf einer möglichst späten Stufe durch Reduktion des Ketons einzuführen.

Schema 7 Synthese von Baustein-II 22



[0030] Die Synthese von Baustein IV 25 wird durch Methylierung der Aminosäure in 2-Position unter Verwendung eines Evans-Auxiliars erreicht (s. Schema 8).

[0032] Es ist uns gelungen, die absolute Konfiguration von Tubulysin durch Abbau und Vergleich mit Referenzsubstanzen aufzuklären. Die für die vier Aminosäure-Bausteine entwickelten Synthesen erlauben nun eine konvergente Totalsynthese der durch Isolierung nur in äußerst geringen Mengen zugänglichen natürlichen Tubulysine A-F. Darüber hinaus erlaubt es diese Strategie, durch Variation der vier Bausteine eine Bibliothek von stereoisomeren und strukturanalogen Tubulysinen herzustellen.

Literatur

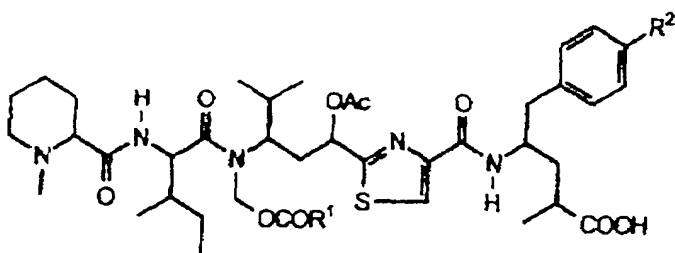
- 1) Sasse et al. (Poster) 10. Irseer Naturstofftage der Dechema e. V., Irsee, 1998.
- 2) a. G. R. Pelitt et al., J. Nat. Prod. 1981, 44, 482-485; b. M. DeArruda et al., Cancer Res. 1995, 55, 3085-3092.
- 3) J. Lukas et al. Collect. Czech. Chem. Commun. 1957, 22, 286.
- 4) A. M. P. Koskinen et al. J. Org. Chem. 1998, 63, 92-98.

[0033] In der Beschreibung und den Ansprüchen können R, R1 und R2 unabhängig voneinander ein H-Atom, eine Alkylgruppe, eine Arylgruppe oder eine Heteroarylgruppe darstellen.

- 15 [0034] Vorzugsweise ist eine Alkylgruppe eine C1-6-Alkylgruppe, weist eine Arylgruppe bis zu vier gegebenenfalls annelierte Ringe auf und weist eine Heteroarylgruppe bis zu vier gegebenenfalls annelierte Ringe auf, wobei jeder Ring bis zu drei Heteroatome wie z. B. N, O oder S-Atome enthalten kann.

Patentansprüche

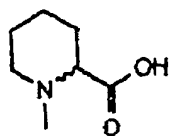
1. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel



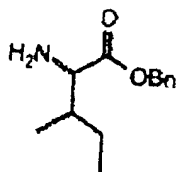
worin R¹ ein H-Atom, eine Alkylgruppe, eine Arylgruppe oder eine Heteroarylgruppe ist und R² ein H-Atom oder eine OH-Gruppe ist,

dadurch gekennzeichnet, daß

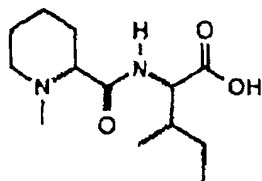
a) eine Verbindung der Formel 3*



mit einer Verbindung der Formel 26

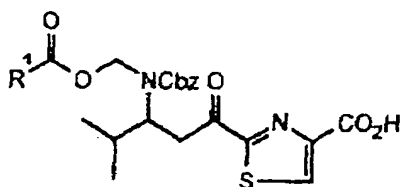


zu einer Verbindung der Formel 27b

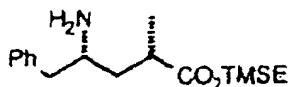


umgesetzt wird;

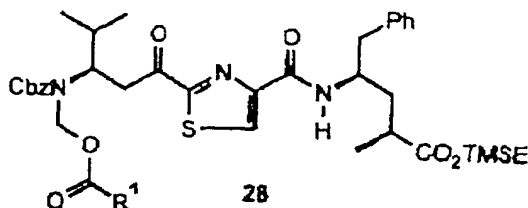
b) eine Verbindung der Formel 22



in der R¹ ein H-Atom, eine Alkylgruppe, eine Arylgruppe oder eine Heteroarylgruppe ist mit einer Verbindung der Formel 25

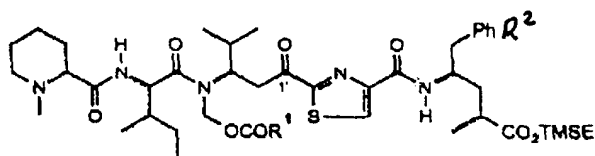


zu einer Verbindung der Formel 28



umgesetzt wird;

c) die Verbindung der Formel 27b mit der Verbindung der Formel 28 zu einer Verbindung der Formel 29



umgesetzt wird;

d) die Ketogruppe am 1'-C-Atom der Verbindung der Formel 29 in eine Acetylgruppe umgewandelt wird;

e) die Diastereomeren getrennt werden, und

f) der TMSE-Ester in eine COOH-Gruppe umgewandelt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) Phosphonsäurediethylester-cyanid/Triethylamin eingesetzt wird.

3. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) Pentafluorphenol/Dicyclohexylcarbodiimid eingesetzt wird.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt c) zunächst Pentafluorphenol-Trifluoracetat und dann Triethylamin/Pd/C, H₂ eingesetzt wird.

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt d) zunächst die Ketogruppe reduziert und dann das 1'-C-Atom acetyliert wird.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt f) Tetrabutylammoniumfluorid eingesetzt wird.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß R eine C1–6-Alkylgruppe, eine Arylgruppe mit bis zu vier gegebenenfalls annelierten Ringen oder eine Heteroarylgruppe mit bis zu vier gegebenenfalls annelierten Ringen ist, wobei jeder Ring bis zu drei Heteroatome wie z. B. N, O oder S-Atome enthalten kann.

8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß R eine Ethyl-, Propyl-, i-Butyl-, sec-Butyl oder tert.-Butylgruppe ist.

9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel 3 als Racemat eingesetzt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel 3 als L-Enantiomer eingesetzt wird.

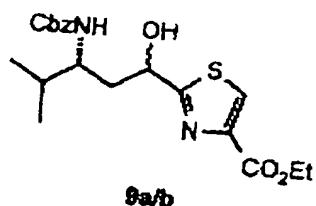
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel 26 als Diastereomerenmischung eingesetzt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel 26 in der allo-Form eingesetzt wird.

13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel 22 als Diastereomerenmischung eingesetzt wird.

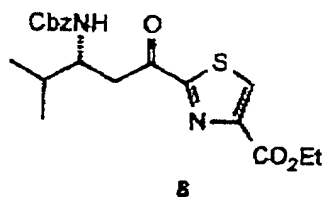
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel 22 diastereomerenrein eingesetzt wird.

15. Verbindung der Formel 9a/b



16. Verbindung nach Anspruch 16 mit einer R,R-, S,S-, R,S- oder S,R-Konfiguration.

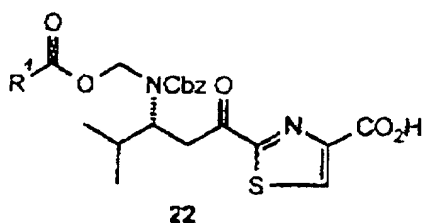
17. Verbindung der Formel 8



dadurch gekennzeichnet, daß sie als L-Form oder als Racemat vorliegt.

18. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 8 – vorzugsweise mit Natriumborhydrid in einem Alkohol – reduziert wird.

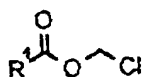
19. Verbindung der Formel 22



worin R¹ ein H-Atom, eine Alkylgruppe, eine Arylgruppe oder eine Heteroarylgruppe ist.

20. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 8

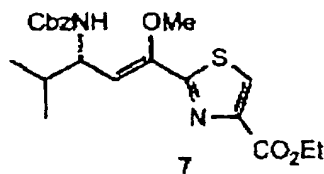
- a) gegebenenfalls mit NaOH in H₂O und
- b) gegebenenfalls mit TMSEOH und DCC versetzt wird und
- c) gegebenenfalls in Gegenwart von NaH mit einer Verbindung der Formel 21



umgesetzt und dann

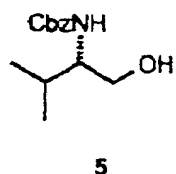
d) gegebenenfalls mit Tetrafluorbutylammoniumfluorid versetzt wird.

21. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel 8 dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 7

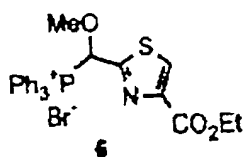


vorzugsweise in Gegenwart einer sauren Verbindung hydrolysiert wird.

22. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel 7 dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 5



oxidiert und mit einer Verbindung der Formel 6

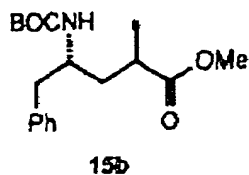


5

umgesetzt wird.

23. Verbindung der Formel 15b

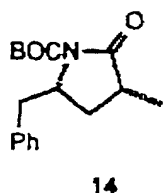
10



15

24. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel 15b dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 14

20



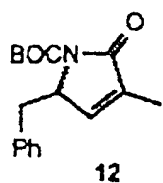
25

einer Ringöffnung unterworfen und das entstandene Produkt verestert wird.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung 15b diastereomerenrein ist.

26. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel 14 dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 12

30

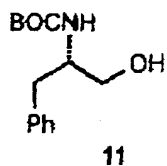


35

hydriert wird.

27. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel 12 dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 11

40



45

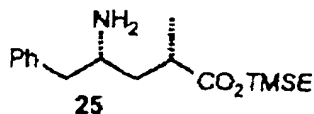
oxidiert und dann um eine C₃-Einheit verlängert wurde.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Oxidation eine Swern-Oxidation ist.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Verlängerung um eine C₃-Einheit durch eine Wittigreaktion erfolgt.

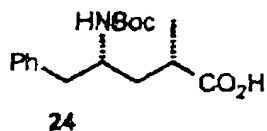
30. Verbindung der Formel 25

55



60

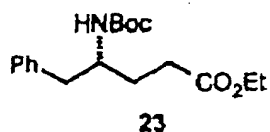
31. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel 25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 24



65

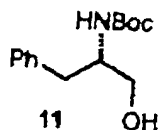
mit TNSEO_H und DCC und dann mit CF₃CO₂H/CH₂Cl₂ umgesetzt wird.

32. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel 24, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 23



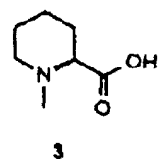
10 in 2-Position methyliert wird, wobei ein Evans-Auxiliar eingesetzt werden kann, und die Esterfunktion dann hydrolysiert wird.

33. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel 23, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 11

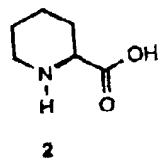


20 zunächst einer Oxidation unterzogen wird und dann im Rahmen einer Wittig Reaktion umgesetzt wird.

34. Verfahren zur Herstellung von einer Verbindung der Formel 3



dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel 2



35 reaktiv aminiert wurde.

35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen der Formeln 2 und 3 in L-Form vorliegen.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1

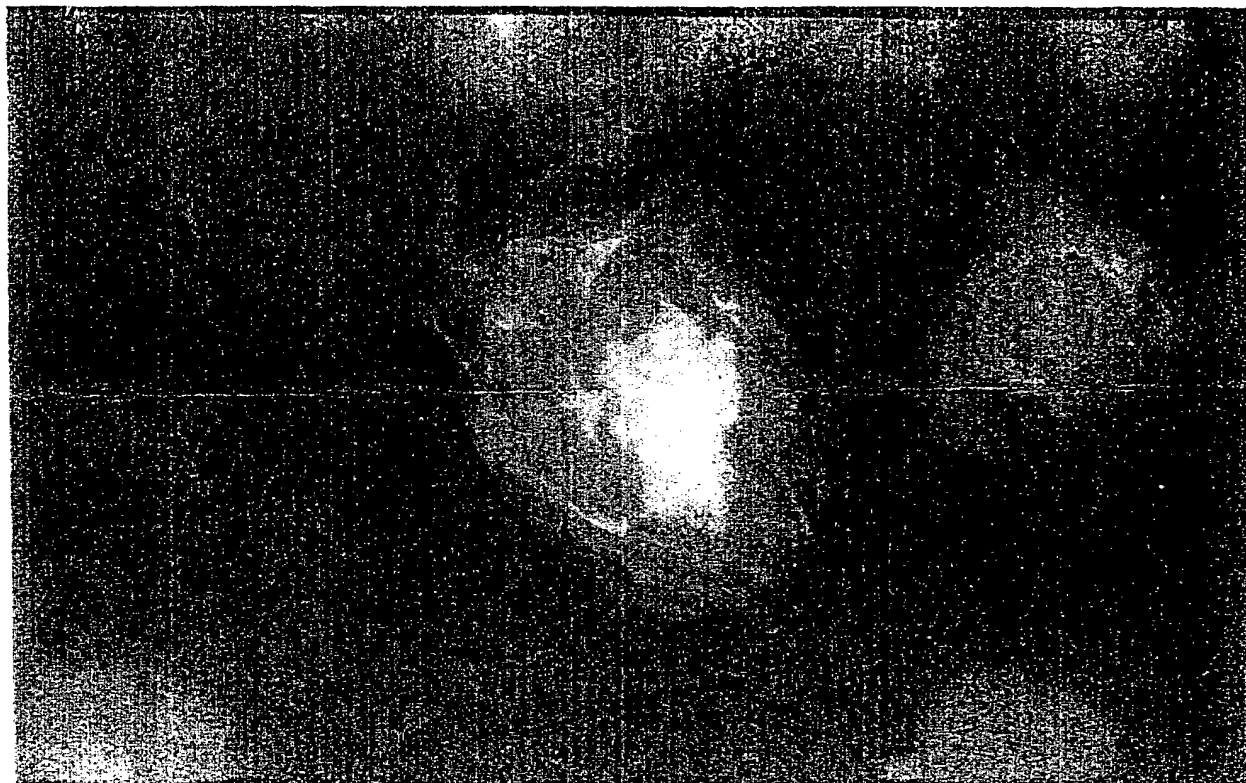
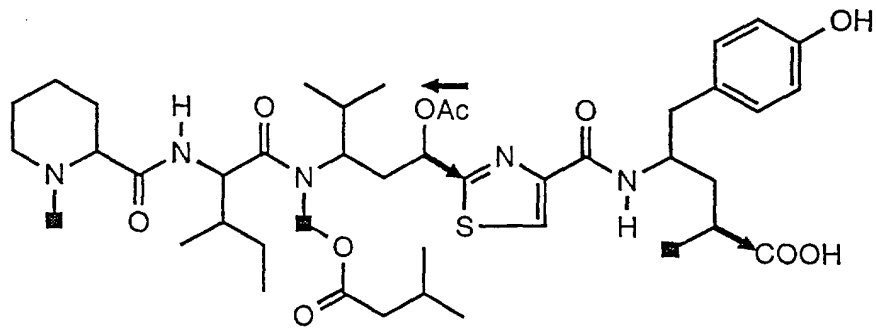
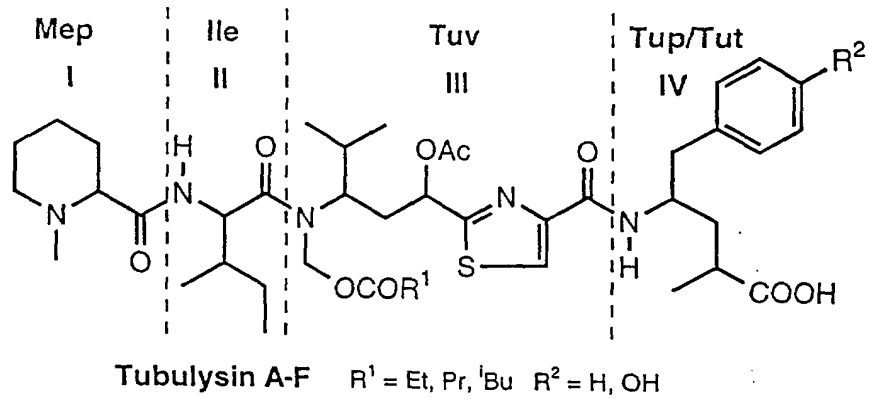


Abb. 2



Einbau von [¹³C₂]Acetat (→) und [¹³C-Me]Methionin (■) in Tubulysin A

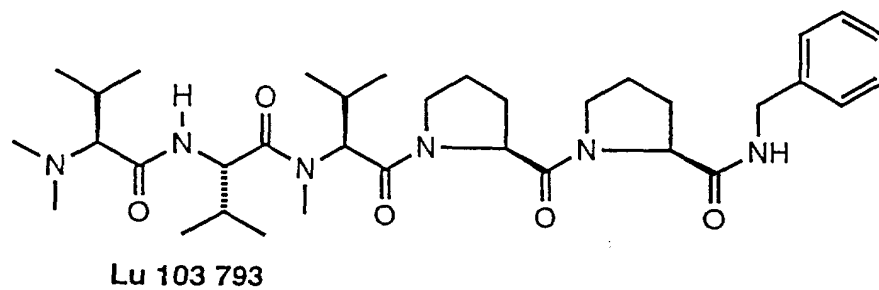
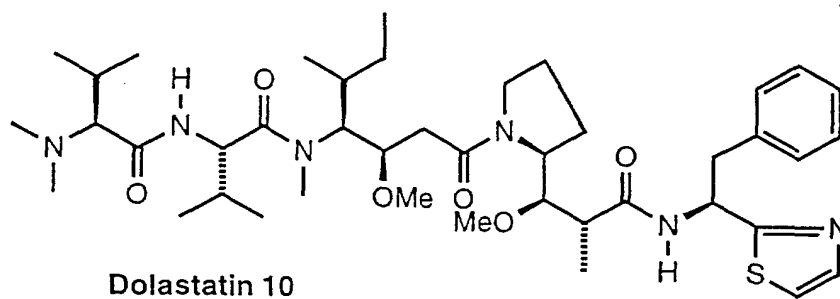


Abb. 3a ¹H-NMR Spektrum von Tubulysin A (DMSO, 400 MHz)

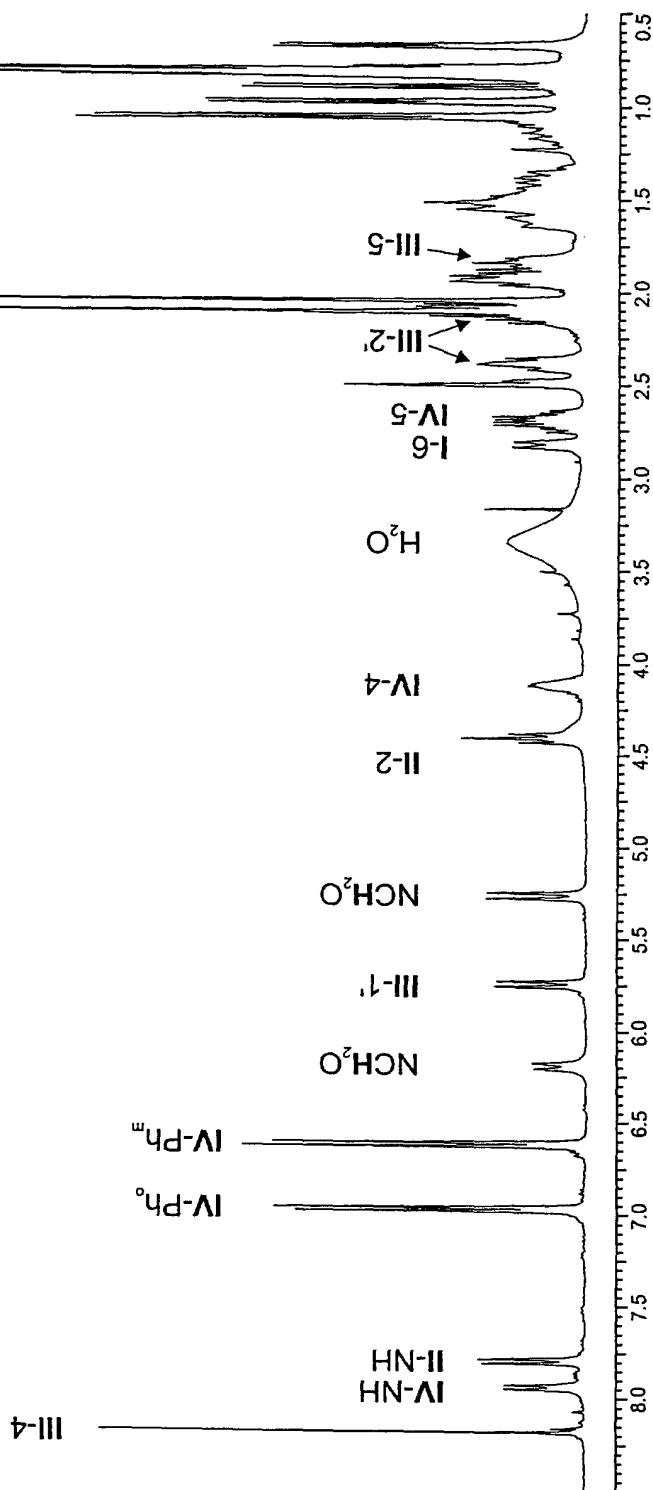


Abb. 3b ^{13}C -NMR Spektrum von
Tubulysin A (DMSO, 400 MHz)

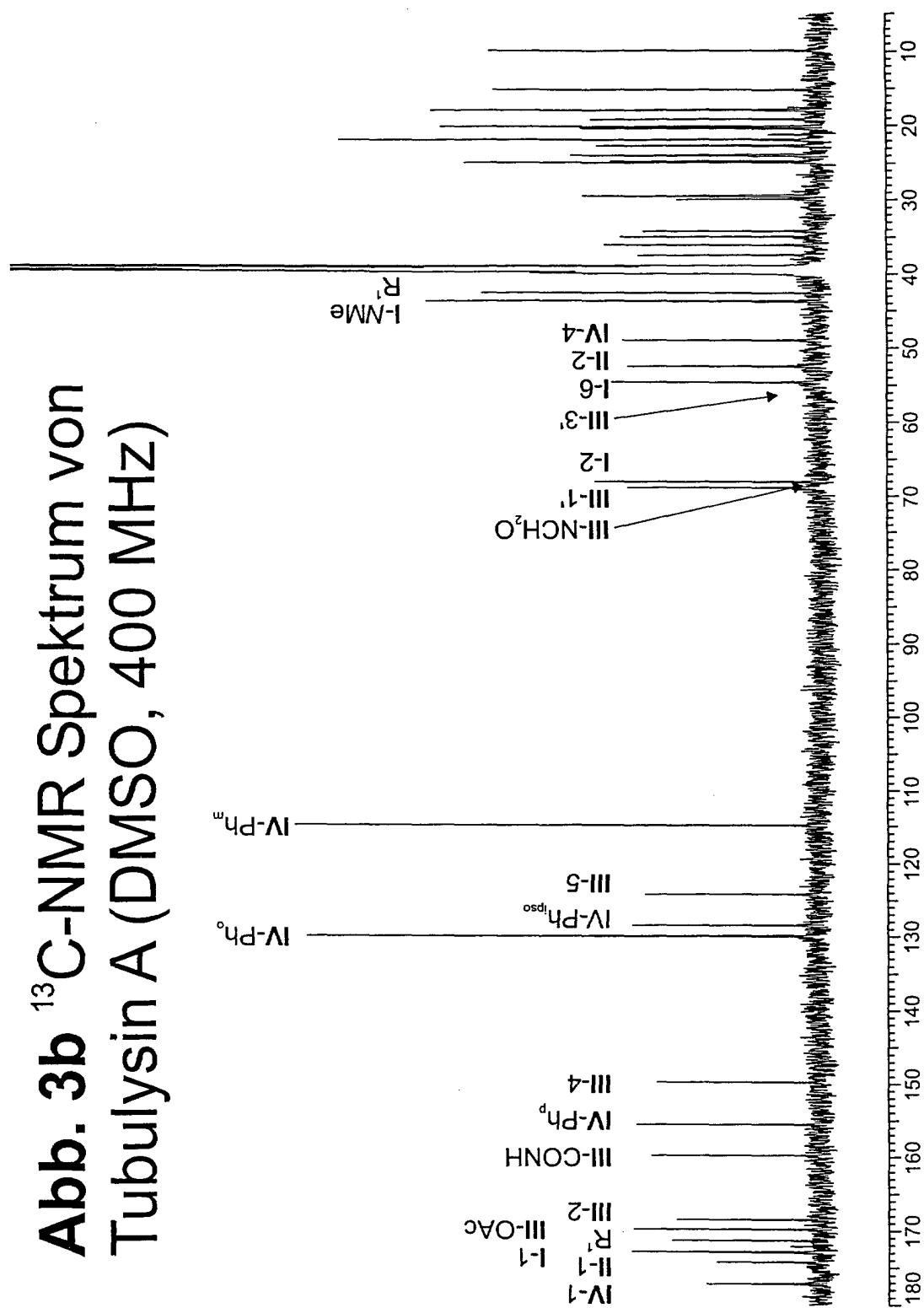


Abb. 4 GC-Spektren von Baustein I
(FS-Hydrodex β -3P, 25m, 120°C)

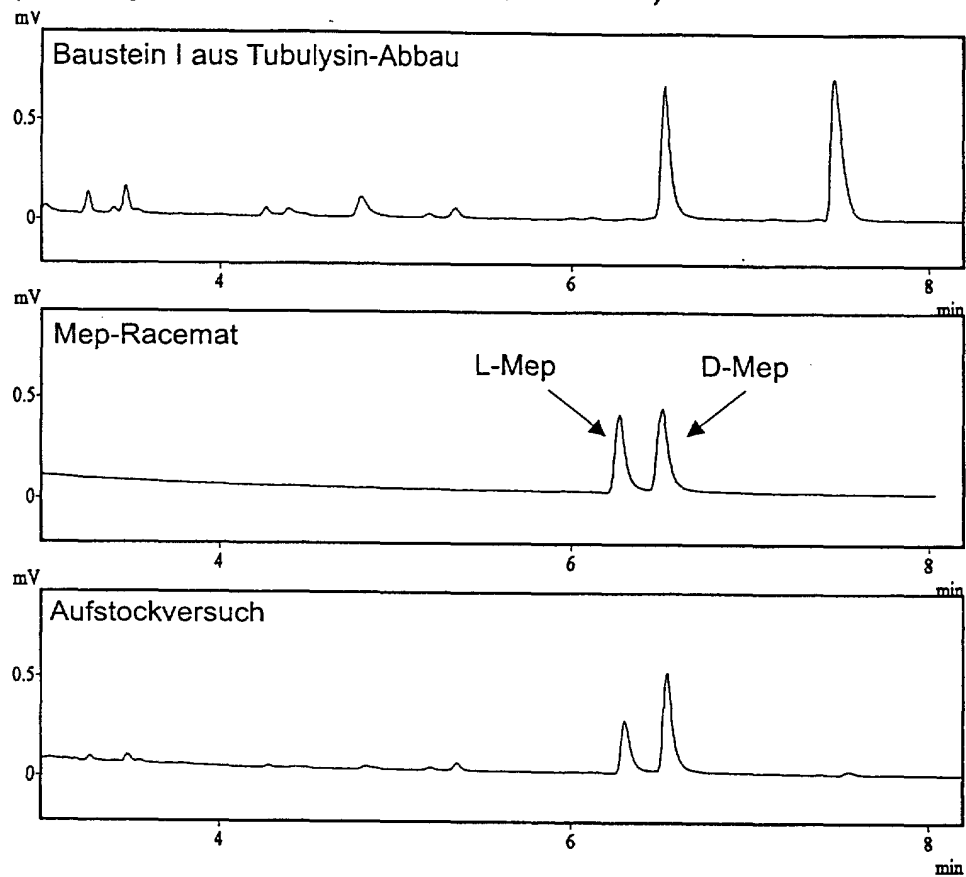


Abb. 5 GC-Spektren von Baustein II
(Permabond L-Chirasil-Val, 25m, 80°C)

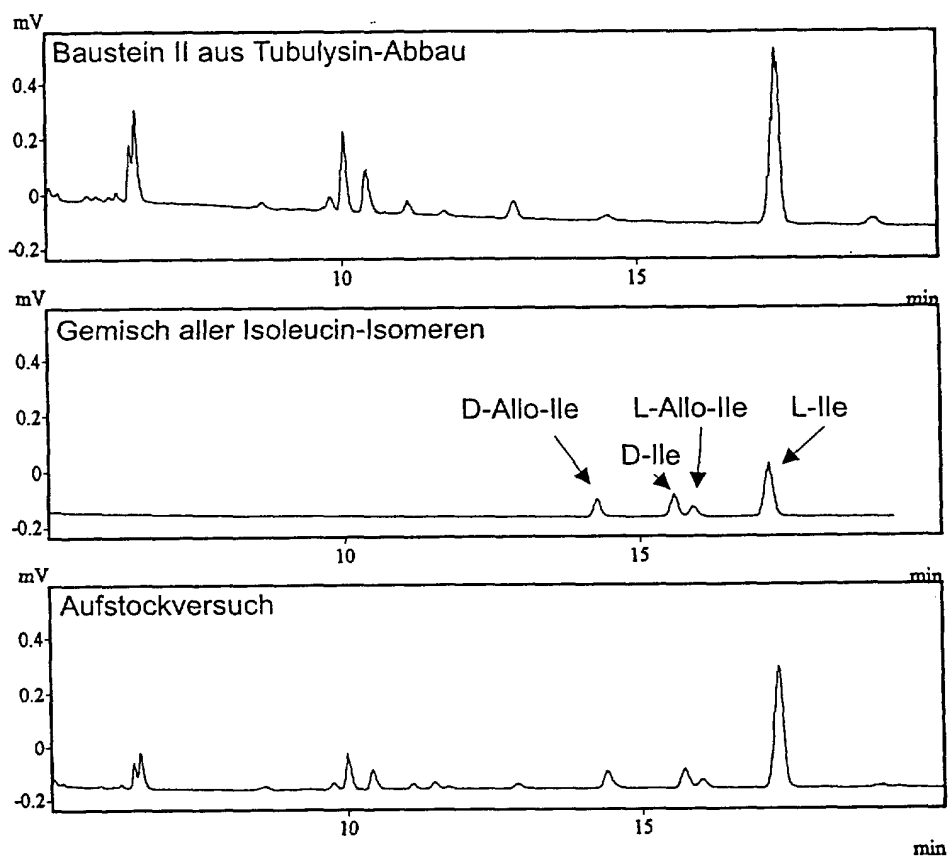


Abb. 6 GC-Spektren von Baustein IV
(FS-Hydrodex β -3P, 25m, 165°C)

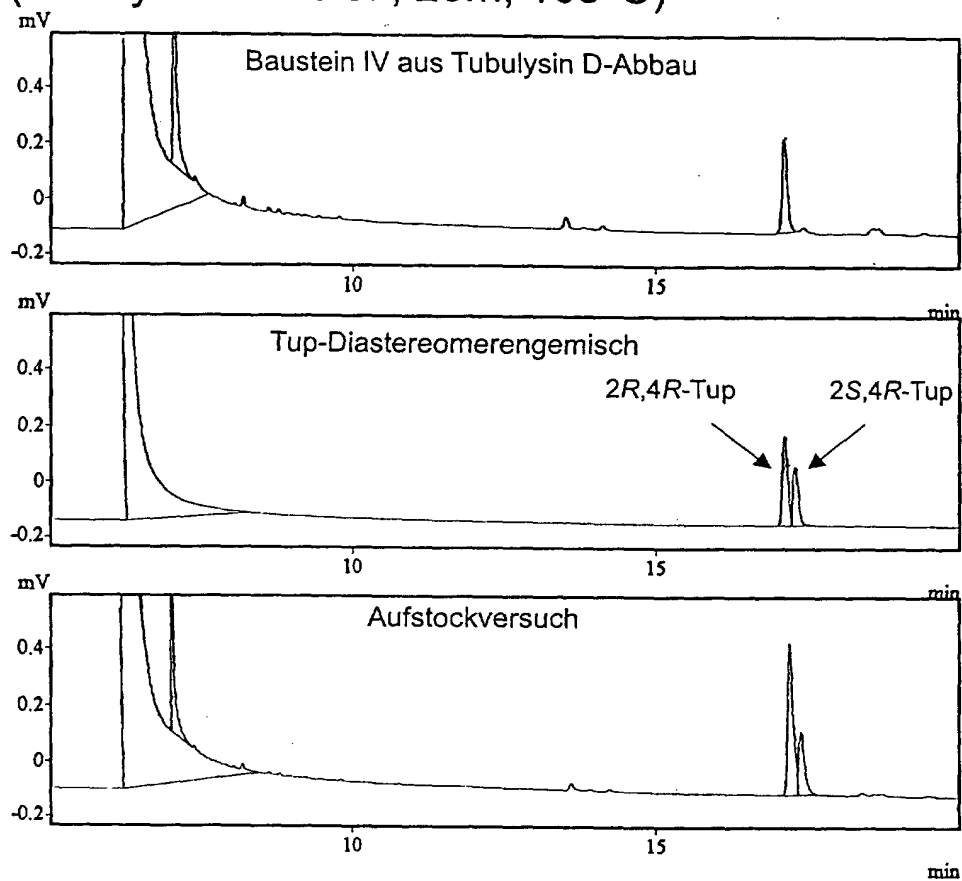


Abb. 7

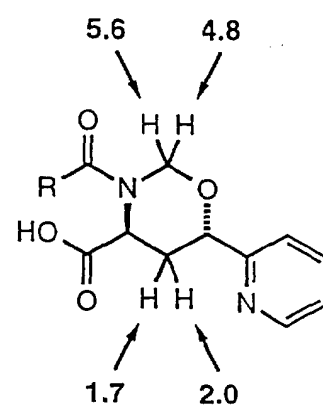
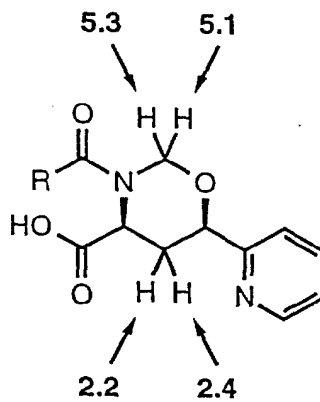
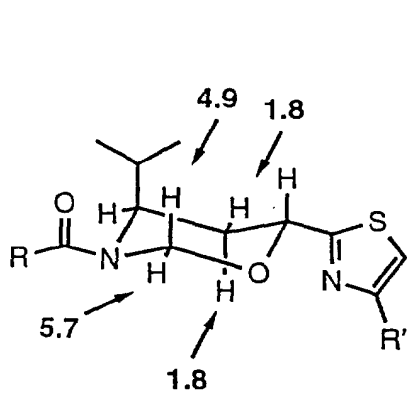


Abb. 8 GC-Spektren von Baustein III
(Permabond L-Chirasil-Val, 25m, 80°C)

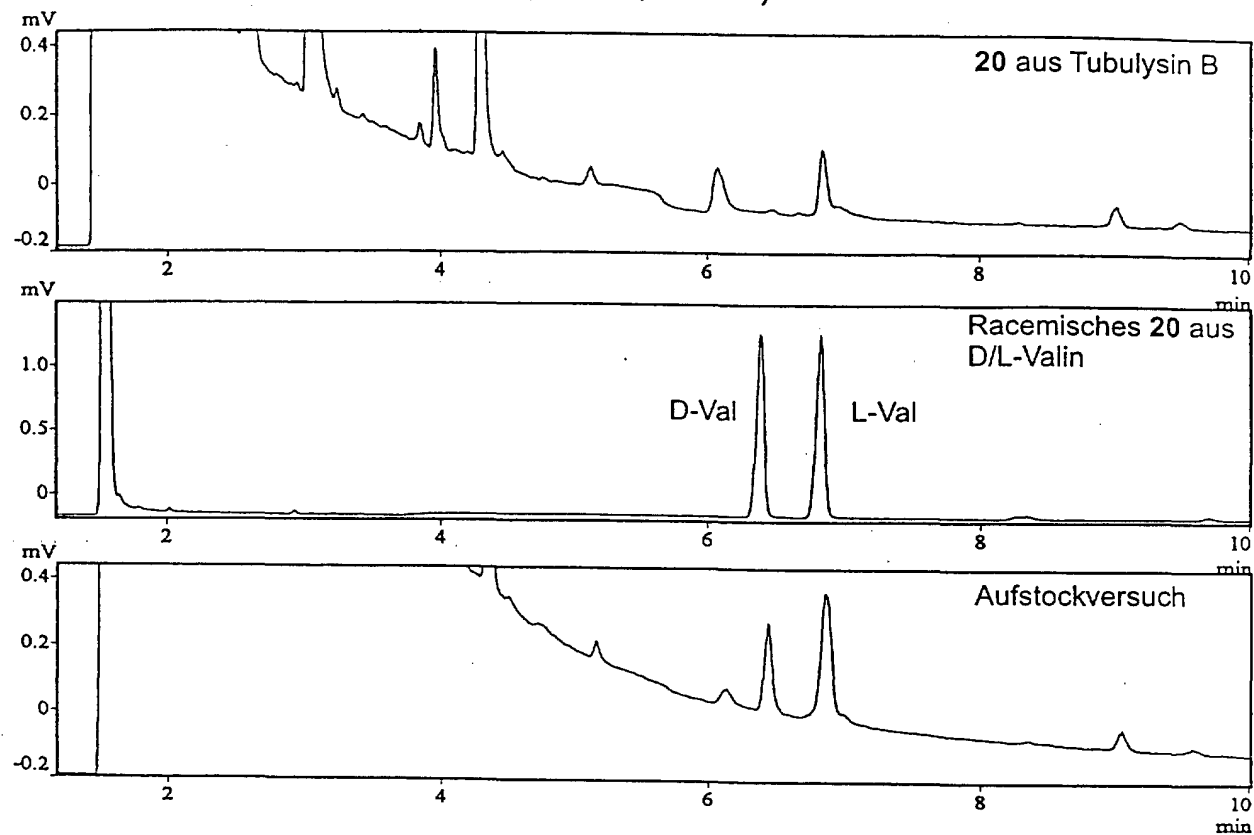
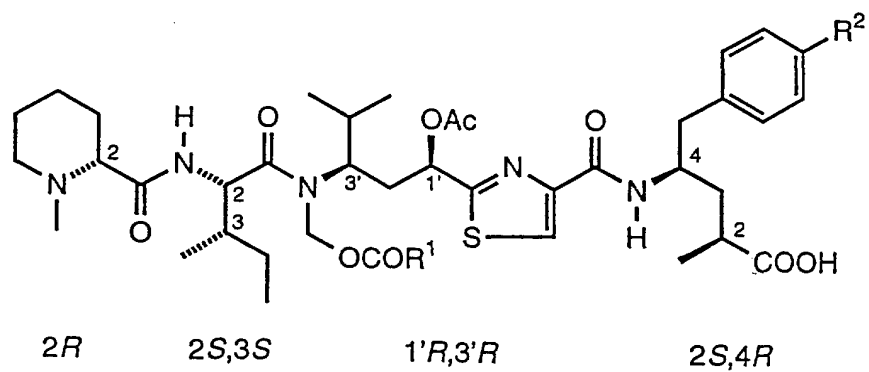


Abb. 9



DERWENT-ACC-NO: 2002-035174

DERWENT-WEEK: 200205

COPYRIGHT 2009 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Production of tubulysin compounds comprises multi-stage process including condensation of N-methylpipecolinoyl-isoleucine with substituted thiazole-4-carboxylic acid derivative

INVENTOR: HOEFLE G; LEIBOLD T ; STEINMETZ H

PATENT-ASSIGNEE: GES BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH[GBFB]

PRIORITY-DATA: 2000DE-1008089 (February 22, 2000)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
DE 10008089 A1	October 31, 2001	DE

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
DE 10008089A1	N/A	2000DE-1008089	February 22, 2000

INT-CL-CURRENT:

TYPE	IPC DATE
CIPS	C07C271/22 20060101
CIPS	C07D207/263 20060101
CIPS	C07D211/60 20060101
CIPS	C07D277/56 20060101
CIPS	C07D417/12 20060101
CIPS	C07F7/18 20060101
CIPS	C07K5/02 20060101

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 10008089 A1**BASIC-ABSTRACT:**

NOVELTY - Tubulysin compounds are produced by a multi-stage process using known and new starting materials and intermediates.

DESCRIPTION - Production of tubulysin compounds (I) comprises:

(A) reaction of a N-methyl-pipecolinic acid (II) with isoleucine benzyl ester (III) to give N-methylpipecolinoyl-isoleucine (IV);

(B) reaction of a substituted thiazole-4-carboxylic acid (V) with a substituted pentanoic acid derivative (VI) to give a 2-(substituted pentanoyl)-thiazole-4-carboxylic acid (VII); and

(C) reaction of compound (IV) with compound (VII) to give a tubulysin precursor (VIII) which is converted into a tubulysin compound (I) by:

- (i) conversion of the 1'-keto group into acetyl;
- (ii) separation of diastereomers; and
- (iii) conversion of TMSE (undefined) into COOH.

R1 = H; alkyl; aryl; or heteroaryl;

R2 = phenyl or 4-OH-phenyl.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for:

(1) compounds of formulae (V), (VI), (IX), (X) (as the L-isomer or racemate) and (XI) and as well as their preparation; and

(2) the preparation of compounds (IIA).

Microtubuli-degrading; centrosome formation promoting.

USE - Compounds (I) are potential cytostatics.

ADVANTAGE - None given in the source material.

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

ORGANIC CHEMISTRY

Preparation: Preparation of compounds (V) comprises:

(1) oxidation of the N-protected aminobutanol of formula (XII);

(2) condensation of the resulting N-protected ketone with a thiazole Wittig ylid of formula

(XIII);

(3) hydrolysis, preferably acidic, of the ethyl 2-(methoxypentenyl)-thiazole-4-carboxylate (XIV) obtained; and

(4) N-acylation of the resulting compound (X) (optionally after treatment with aqueous sodium hydroxide and/or TMSEOH/DCC (undefined) and optionally in the presence of sodium hydride) with an acyl halide $R-CH_2-C(O)OCl$ (XV) and optional treatment with tetrafluorobutylammonium fluoride.

Preparation of compounds (VI) comprises:

(1) oxidation of the N-protected-alcohol (XVI) and subjecting the resulting ketone to a Wittig reaction;

(2) methylation and subsequent hydrolysis of the N-protected pentanoic acid ester (XVII) obtained; and

(3) reaction of the resulting N-protected pentanoic acid (XVIII) with TMSEOH/DCC and then with trifluoroacetic acid/dichloromethane.

Compounds (IX) are prepared by reduction of a compound (X), preferably using sodium borohydride in an alkanol.

Preparation of compounds (XI) comprises:

(1) oxidation and subsequent chain-lengthening by 3C of N-protected alcohol (XIX);

(2) hydrogenation of the resulting N-protected

pyrrolinone (XX); and

(3) subjecting the N-protected pyrrolidinone (XXI) to ring opening and subsequent esterification.

Preparation of compounds (IIA) comprises reductive amination of a corresponding N-unsubstituted pipecolic acid.

Preferred Process: Step (A) is carried out in the presence of phosphonic acid diethyl ester cyanide/triethylamine. Step (B) is carried out in the presence of pentafluorophenol/dicyclohexylcarbodiimide. Step (C) is carried out firstly in the presence of pentafluorophenol/trifluoroacetate and then using hydrogen in the presence of triethylamine/palladium on carbon.

None given in the source material.

TITLE-TERMS: PRODUCE COMPOUND COMPRISE MULTI
STAGE PROCESS CONDENSATION N
ISOLEUCINE SUBSTITUTE THIAZOLE
CARBOXYLIC ACID DERIVATIVE

DERWENT-CLASS: B03 B05

CPI-CODES: B05-B02C; B06-H; B07-D05; B07-
F01; B07-H; B10-A12C; B14-H01;

CHEMICAL-CODES: Chemical Indexing M2 *01*
Fragmentation Code F011 F012 F433
H1 H181 H2 H201 J0 J011 J1 J111
M210 M211 M273 M281 M320 M413
M510 M521 M530 M540 M720 N261
N333 N511 N512 N513 N514 N515
Specific Compounds RA5W7L
Registry Numbers 485044

Chemical Indexing M2 *02*
Fragmentation Code B614 B711 B720
B743 B793 B831 F010 F011 F012
F014 F019 F020 F433 F710 G010
G020 G021 G040 G100 G221 H1 H181
H2 H201 J0 J014 J2 J211 J231 J271
J3 J312 J371 J5 J581 K0 L6 L640
M210 M211 M212 M213 M214 M215
M216 M220 M221 M222 M223 M224
M225 M226 M231 M232 M233 M250
M262 M273 M281 M283 M311 M315
M321 M323 M331 M333 M340 M342
M349 M381 M383 M391 M393 M411
M510 M522 M523 M530 M531 M540
M720 N209 N241 N261 N282 N309
N331 N362 N511 N512 N513 N514
N515 P633 Markush Compounds
005336701

Chemical Indexing M2 *03*
Fragmentation Code B514 B711 B720
B743 B793 B831 G010 G100 H1 H100
H181 M210 M211 M250 M283 M315
M321 M331 M343 M371 M391 M411
M510 M520 M531 M540 M710 M720
N224 N242 N261 N262 N309 N311
N382 N511 N512 N513 N514 N515
Specific Compounds RA5W7G

Registry Numbers 485034

Chemical Indexing M2 *04*
Fragmentation Code F012 F014 F710
G010 G100 J0 J011 J2 J211 J5 J581
K0 L4 L463 M210 M212 M272 M281
M311 M315 M321 M333 M342 M373
M381 M391 M413 M510 M521 M531
M540 M710 M720 N242 N321 N362
N511 N512 N513 N514 N515 Specific
Compounds RA5W7I Registry Numbers
485038

Chemical Indexing M2 *05*
Fragmentation Code F012 F014 F710
G010 G100 H4 H401 H481 H8 J0 J011
J2 J211 K0 L4 L463 M210 M212 M272
M281 M311 M315 M321 M333 M342
M343 M373 M392 M413 M510 M521
M531 M540 M710 M720 N209 N242
N321 N333 N341 N362 N511 N512
N513 N514 N515 Specific Compounds
RA5W7J Registry Numbers 485039

Chemical Indexing M2 *06*
Fragmentation Code G010 G019 G100
J0 J011 J2 J271 K0 L4 L463 M210
M211 M272 M281 M311 M315 M321
M331 M342 M343 M371 M373 M391
M414 M510 M520 M532 M540 M710
M720 N212 N213 N262 N305 N309
N312 N321 N333 N511 N512 N513
N514 N515 Specific Compounds
RA5W7M Registry Numbers 485045

Chemical Indexing M2 *07*
Fragmentation Code F010 F012 F014

F020 F710 G010 G019 G020 G021
G040 G100 G111 G221 J0 J012 J1
J111 J2 J211 J231 J271 J5 J581 K0
L4 L463 L6 L640 M210 M211 M212
M213 M214 M215 M216 M220 M221
M222 M223 M224 M225 M226 M231
M232 M233 M262 M280 M281 M311
M315 M321 M333 M342 M381 M383
M391 M413 M510 M521 M522 M531
M532 M540 M710 M720 N209 N213
N242 N261 N321 N333 N341 N343
N362 N511 N512 N513 N514 N515
Markush Compounds 005336702

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: 2002-010126